I MICRORGANISMI CONTAMINANTI E IL LORO RILEVAMENTO: NOVITA' E CAMBIAMENTI

Charles G. EDWARDS
Food Scientist (Enology)/Professor, Department of Food Science and Human Nutrition, Program in Viticulture and Enology, Washington State University, Pullman, WA, USA

Seminario presentato a Enoforum 2007,13-15 Marzo, Piacenza, Italia

Introduzione

Alcuni autori ritengono che l'incidenza dei microrganismi contaminanti sia aumentata in questi ultimi anni. Sebbene non tutti gli enologi siano di questo parere, due aspetti potenzialmente importanti sono l'aumento del pH del mosto e l'applicazione più ampia di metodi di analisi più accurati.

Gli enologi hanno sperimentato vendemmie più tardive per migliorare il profilo aromatico e tannico. In molti casi, la qualità del vino è migliorata. Comunque, una conseguenza di tale pratica è che l'uva spesso ne risente, in quanto pH più elevati favoriscono la crescita di vari microrganismi (Davis *et al.*, 1986a). Il pH del mosto influenza l'efficacia della SO_2 , in quanto all'aumentare del pH la parte molecolare antimicrobica della SO_2 diminuisce. In tal modo, alcuni hanno suggerito che il prolungamento del periodo prima della vendemmia possa avere un impatto negativo sulla qualità del vino, favorendo lo sviluppo di microrganismi indesiderati.

Un altro aspetto è stato l'applicazione di metodi più accurati per la ricerca dei microrganismi nei mosti e nei vini. Probabilmente i più importanti sono le cosiddette tecniche molecolari in "tempo reale". Basati sulla determinazione delle somiglianze a livello dei geni, questi metodi sono utilizzati per identificare e in alcuni casi quantificare le popolazioni microbiche. Anche se questi metodi offrono incredibili opportunità per migliorare il controllo microbiologico durante la vinificazione, vi sono limitazioni nell'utilizzo di routine per l'analisi dei vini.

Questo articolo riassume l'impatto di alcuni microrganismi, *Brettanomyces*, *Pediococcus,* e *Lactobacillus*, sulla qualità del vino e alcuni metodi di rilevamento.

Brettanomyces

I lieviti *Brettanomyces/Dekkera* sono microrganismi, la cui crescita può determinare intorbidamento o la produzione di odori sgradevoli, talvolta descritti come medicinali, di topo, 'Band-aid®, di 'cortile,' o altri (Gilliland, 1961; Heresztyn, 1986; Fugelsang *et al.*, 1993; Sponholz, 1993). Le specie di *Brettanomyces* isolate dai vini sono state riclassificate diverse volte e *D. bruxellensis* e *D. anomala* attualmente sono riconosciuti come i microrganismi responsabili di alcune alterazioni del vino (Grbin and Henschke, 2000).

Mentre molti microrganismi del vino come *Acetobacter*, *O. oeni*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus* e *Saccharomyces* possono sintetizzare il 4-vinil guaiacolo o il 4-vinil fenolo rispettivamente dagli acidi ferulico e *p*-cumarico (Figura 1), molti non sono in grado di ridurre i composti intermedi del vinile a 4-etil-guaiacolo o a 4-etil-fenolo (Chatonnet *et al.*, 1992; 1995; Shinohara *et al.*, 2000). Per questo motivo, l'analisi del 4-etil-fenolo viene usata come indicatrice di contaminazioni da *Brettanomyces*. Comunque, alcuni microrganismi, tra i più noti *L. plantarum* (Chatonnet *et al.*, 1992; 1995; Cavin *et al.*, 1993) e *Pichia guilliermondii* (Dias *et al.*, 2003), o producono piccole quantità di questi etil fenoli o non sopravvivono nel vino. La recente scoperta di *Candida pararugosa* e *Pichia guillermondii* in vini contaminati nel Washington State che non contenevano *Brettanomyces* (dati non

riportati) suggerisce che altri microrganismi possono, di fatto, produrre fenoli volatili nei vini in determinate condizioni.

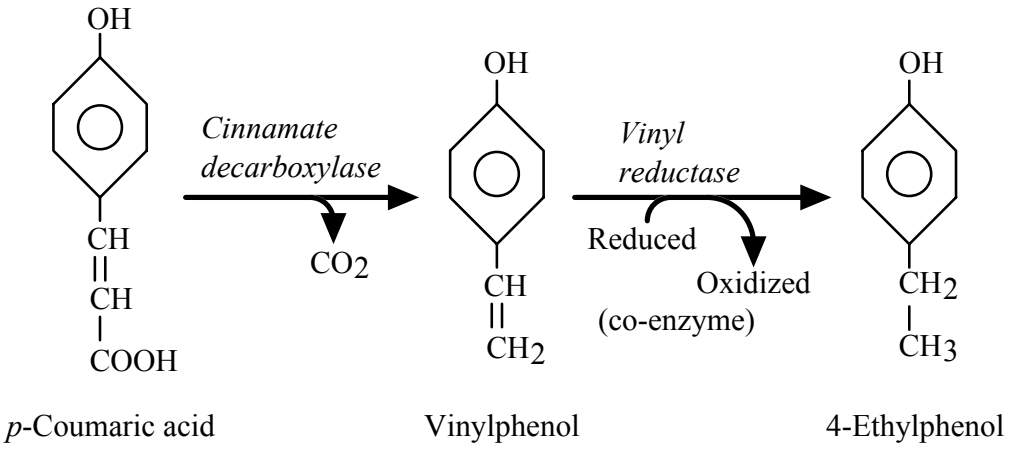

Figura 1. Formazione del 4-etil fenolo dall'acido cumarico.

Il controllo della crescita dei lieviti contaminanti in una cantina non è facile. Infatti, *Brettanomyces* sembra essere relativamente resistente ai solfiti; per questo gli enologi aggiungono in genere da 0.4 a 0.6 mg/L di anidride solforosa molecolare per limitarne la diffusione. Comunque, non vi sono molte informazioni sulla tossicità dei solfiti nei riguardi di questo lievito inquinante.

Pediococcus

I pediococchi sono sferici, Gram positivi, non mobili, catalasi negativi, da aerobi a microaerofili (Garvie, 1986; Carr *et al.*, 2002). *Pediococcus* è l'unico batterio lattico che si divide in due piani, apparendo al microscopio come tetradi o grandi gruppi di cellule (Garvie, 1986; Axelsson, 1998). Le specie riconosciute sono *P. acidilacti, P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus, P. inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus e P. urinae-equi* (Garvie, 1986). Secondo il Comitato Internazionale di Batteriologia Sistematica una specie che sembra presente nei vini, *P. cerevisiae,* non era descritta in modo corretto, in quanto rappresentava almeno due specie differenti, *P. damnosus* e *P. pentosaceus* (Garvie, 1974; 1986; Raccach, 1987).

Ecologia

Sebbene *P. damnosus* sia stato isolato nei mosti di uva (Lonvaud-Funel *et al.*, 1991), si conosce ancora poco sull'ecologia di altre specie. In uno studio completo di Costello *et al.* (1983), vennero isolati nei mosti e nei vini diversi batteri lattici in diversi momenti nel corso della vinificazione e tra questi vi era anche *Pediococcus* spp. (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983b; Fleet *et al.*, 1984; Davis *et al.* 1986a; 1986b; Sieiro *et al.*, 1990). Le specie di *Pediococcus* isolate nel vino comprendono *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus* e in minor misura *P. inopinatus* (Davis *et al.*, 1986b; Garvie, 1986; Edwards and Jensen, 1992; Manca de Nadra e Strasser de Saad, 1995). I pediococchi si trovano comunemente nei vini rossi nel corso della maturazione in barrique (Edwards and Jensen, 1992).

Oltre al pH, la crescita di *Pediococcus* nel vino viene influenzata da un insieme di condizioni come la SO_2, l'etanolo e il lisozima. Secondo Edwards e Jensen (1992) i pediococchi isolati nei vini prodotti in Washington tendevano a crescere più lentamente con 30 mg/L di SO_2 totale e solo uno dei dieci ceppi

analizzati cresceva con il 14% di etanolo. Un lavoro di Davis *et al.* (1988) sui batteri lattici isolati nei vini rossi australiani indicava che i ceppi di *L. oenos* (*O. oeni*) erano meno tolleranti all'anidride solforosa dei ceppi di *P. parvulus*. Davis *et al.* (1988) suggerirono che i vini con un'alta concentrazione di SO_2 totale potrebbero essere più favorevoli alla crescita di *Pediococcus* che non alla crescita di *L. oenos*, in disaccordo con Hood (1983), che asseriva che i pediococchi erano meno tolleranti alla SO_2 legata rispetto ai lattobacilli o i leuconostoc. *Pediococcus* spp. sono anche sensibili al lisozima, ma più resistenti di altri batteri. Come esempio, Delfini *et al.* (2004) notarono che *P. parvulus* sopravviveva a concentrazioni di 500 mg/L, generalmente più alte di *Lactobacillus* (da 200 a 500 mg/L) o *Oenococcus* (da 50 a 100 mg/L).

L'alterazione del vino

Pediococcus spp. nei vini produce odori sgradevoli e sapori che possono essere descritti come "amaro", "troppo burro" o persino di "calze sporche". I pediococchi sono in grado di produrre anche il di-acetile, un composto che ricorda il "burro" e che ad alte concentrazioni diventa negativo (Sponholz, 1993). Alcune specie sono anche in grado degradare il glicerolo ad acroleina, un composto che reagisce con i fenoli determinando un sentore più amaro (Davis *et al.*, 1988; Sponholz, 1993; Du Toit and Pretorius, 2000).

Oltre a produrre odori sgradevoli, *Pediococcus* spp. sono implicati nella produzione di polisaccaridi extracellulari. Questi omoglucani vengono prodotti dal glucosio e consistono in un'unità trisaccaridica, che si ripete con legame in posizione (1→3) e una catena legata in posizione (1→2) in uno dei gruppi D-glucopiranosilici (Llauberes *et al.*, 1990). Questi polimeri causano un aumento della viscosità del vino (Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995). Si pensa che i pediococchi associati a tale difetto abbiano una maggiore tolleranza all'etanolo rispetto ad altri ceppi (Du Toit and Pretorius, 2000).

P. damnosus è il maggior responsabile della produzione di polisaccaridi nel vino; anche *P. pentosaceus* può essere coinvolto (Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995; Lonvaud-Funel, 1999). Poiché i ceppi di *P. damnosus* che producono i polisaccaridi contengono un plasmide 4kb, Lonvaud-Funel *et al.* (1993) svilupparono una sonda DNA per il rilevamento. Più recentemente, Gindreau *et al.* (2001) hanno descritto un metodo di rilevamento di questi ceppi basato sull'uso di una reazione diretta polimerasica a catena (PRC).

Sebbene la crescita di certi *Pediococcus* spp. Nei vini non sia desiderata, Edwards and Jensen (1992) isolarono i pediococchi in molti vini di alta qualità. Un lavoro seguente di Edwards *et al.* (1994) mise in luce che alcuni di questi ceppi (*P. parvulus*) alteravano il bouquet, senza rovinarlo, di un vino di Cabernet Sauvignon che non aveva svolto la MLF. Inoltre, Silver e Leighton (1981) notarono che il ceppo B44-40, che inizialmente si pensava fosse *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*), ma attualmente riconosciuto come *Pediococcus* (Kelly *et al.*, 1989), catalizzava la MLF nei vini senza formare odori o sapori sgradevoli. E' quindi possibile che, in determinate condizioni, la crescita di certi pediococchi nel vino possa apportare sapori e aromi gradevoli.

Interazioni con *Oenococcus*

A causa dell'aumento del pH dopo la MLF, la fermentazione secondaria può incoraggiare la crescita dei batteri lattici come *Pediococcus* (Davis *et al.*, 1986a). Comunque, Edwards *et al.* (1994) osservarono un deciso antagonismo da parte di *O. oeni* nei confronti di *Pediococcus* in un vino Cabernet Sauvignon e Merlot, che avevano svolto la MLF (Figura 2). La vitalità di tutti i ceppi di pediococchi diminuì da una popolazione iniziale di 10^5 fino a tra <300 e 10^4 CFU/mL poco dopo l'inoculo. Per esempio, mentre la vitalità del WS-29A diminuì di circa 1 log, il C5 non venne isolato nel Cabernet Sauvignon dopo la MLF già a meno di un'ora dall'inoculo. La diminuzione della vitalità di *P. parvulus* dopo l'inoculo nei vini che avevano svolto la MLF sostiene l'ipotesi che la MLF conferisce stabilità microbiologica al vino. In accordo con ciò, Walling *et al.* (2005) notarono che i vini che avevano

svolto la MLF erano più resistenti al filante causato dai pediococchi. Comunque, è anche chiaro che l'apparente "stabilità" biologica conferita dalla MLF non è necessariamente permanente, poiché molti ceppi di pediococchi alla fine arrivavano a popolazioni pari a 10^6 CFU/mL.

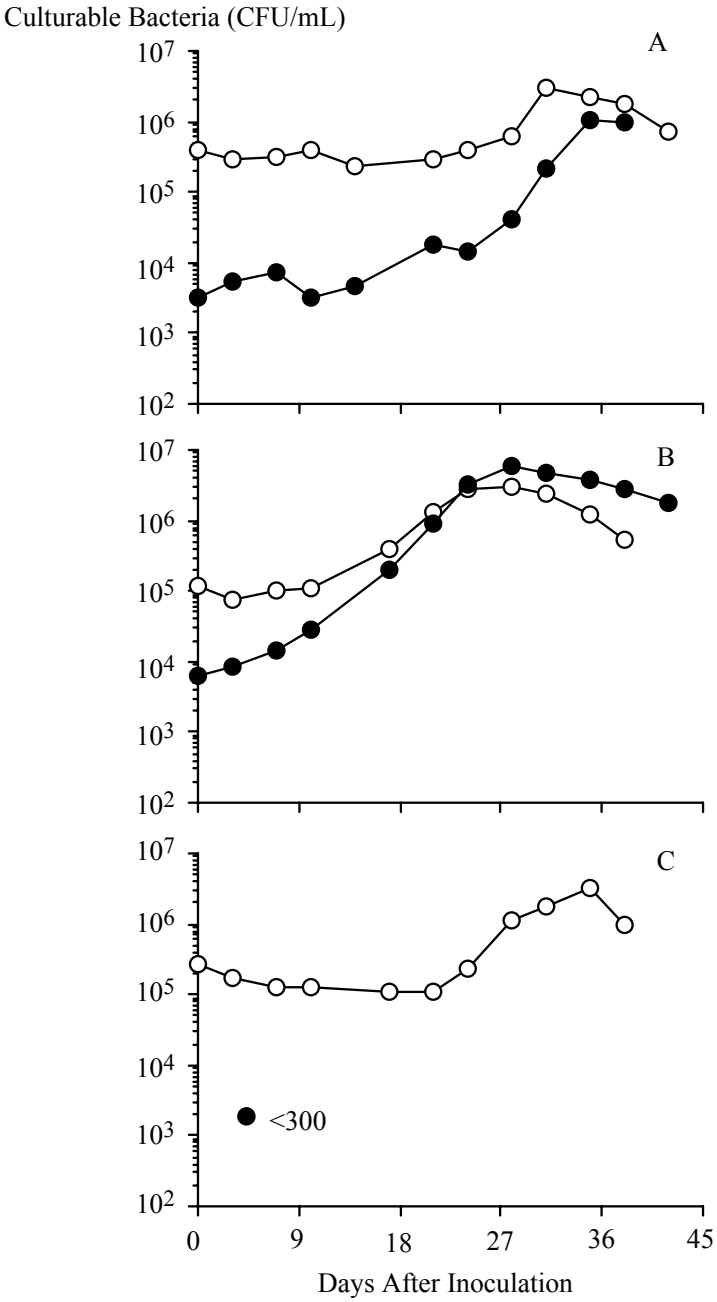

Figura 2. Crescita dei ceppi WS-9 (A), WS-29A (B) e C5 (C) di Pediococcus parvulus inoculati in vini Merlot senza MLF (punti vuoti) o con MLF (punti pieni) indotta da Oenococcus oeni. Tratto da Edwards et al. (1994).

Sono stati pubblicati altri lavori che descrivono le interazioni tra i batteri lattici. Sebbene *O. oeni* inibisca *Pediococcus* (Edwards *et al.*, 1994), Davis *et al.* (1986a) notarono che la crescita di *P. parvulus* si

opponeva alla sopravvivenza di *O. oeni* dopo la FML in alcuni vini rossi australiani. Inoltre, Lonvaud-Funel e Joyeux (1993) osservarono una forte inibizione di *O. oeni* da parte di un ceppo di *P. pentosaceus*. Questi autori hanno ipotizzato che tale effetto fosse causato dall'accumulo di piccoli composti (meno di 1 kD), molto probabilmente di peptidi o proteine.

Oltre ai batteri lattici, è possibile che la crescita di *Pediococcus* possa influenzare altri microrganismi come *Brettanomyces*. E' risaputo che *Brettanomyces* produce 4-etil-guaiacolo e 4-etil fenolo, composti che hanno origine dall'acido ferulico e acido *p*-cumarico, rispettivamente. La reazione avviene in due passaggi con un'iniziale decarbossilazione dell'acido idrossicinnamico catalizzata dalla cinnamato decarbossilasi e la riduzione dei composti intermedi del vinil fenolo da parte della vinil fenolo reduttasi (Figura 1). Mentre molti microrganismi del vino come *Acetobacter*, *O. oeni*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, e *Saccharomyces* possono sintetizzare il 4-vinil guaiacolo o il 4-vinil fenolo rispettivamente dagli acidi ferulico e *p*-cumarico molti non sono in grado di ridurre gli intermedi del vinile a 4-etil guaiacolo o 4-etil fenolo (Chatonnet *et al.*, 1992; 1995; Shinohara *et al.*, 2000; Dias *et al.*, 2003).

Sebbene non sia stati identificato nessun co-enzima coinvolto nella seconda reazione, un possibile beneficio per *Brettanomyces* sarebbe la riossidazione del NADH. In condizioni anaerobiche come quelle dei vini, la disponibilità del NAD^+ può essere limitante per il metabolismo dei carboidrati. In tal modo *Brettanomyces* potrebbe teoricamente ridurre i vinil fenoli sintetizzati da altri microrganismi del vino, beneficiando così della crescita di altri microrganismi nel corso della maturazione (per es., *Pediococcus*).

Lactobacillus

Le specie di *Lactobacillus* isolate nell'uva e nei vini includono *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeei*, *L. leichmanni*, *L. nagelii*, *L. plantarum*, e *L. trichodes* (Douglas e Cruess, 1936; Vaughn, 1955; Fornachon, 1957; Du Plessis and van Zyl, 1963; Pilone *et al.*, 1966; Chalfan *et al.*, 1977; Maret and Sozzi, 1977; 1979; Costello *et al.*, 1983, Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983b; Davis *et al.*, 1986a; 1986b; Dicks and van Vuuren, 1988; Sieiro *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1993; 1998a; 2000). *L. cellobiosus* è considerato un biotipo di *L. fermentum* mentre *L. leichmanni* viene attualmente denominato *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Kandler and Weiss, 1986). *L. trichodes*, conosciuto come "Fresno mold" (Amerine and Kunkee, 1968), è considerato un sinonimo di *L. fructivorans* (Weiss *et al.*, 1983). Si ritiene che *L. vermiforme*, una specie anch'essa trovata nel vino (dati non pubblicati), sia classificata in modo erroneo e dovrebbe appartenere a *L. hilgardii*. La relazione tra *L. vermiforme* e *L. hilgardii* non è stata ancora risolta.

Nonostante *Lactobacillus* possa indurre la fermentazione secondaria nei vini, la fermentazione malolattica, molte specie sono ritenute dannose (Vaughn, 1955; Gini and Vaughn, 1962; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a; Davis *et al.*, 1985; 1986b; Wibowo *et al.*, 1985). Per esempio, alcuni lattobacilli possono produrre diacetile e acetoino (El-Gendy *et al.*, 1983; Benito de Cárdenas *et al.*, 1985; Montville *et al.*, 1987) o sostituire tetraidropiridine (Heresztyn, 1986), composti che possono conferire caratteristiche indesiderate ai vini. La crescita di batteri lattici in vini imbottigliati può portare ad intorbidamento, sedimento, formazione di gas, odori sgradevoli, acidità volatile eccessiva e/o acido lattico (Rankine and Bridson, 1971; Splittstoesser and Stoyla, 1987). Sebbene i lattobacilli non possano crescere a concentrazioni di etanolo >15% (v/v) o a pH inferiori a 3.5 (Wibowo *et al.*, 1985), ceppi di *L. trichodes* sono stati isolati da vini da dessert che contenevano il 20% di alcol (Splittstoesser and Stoyla, 1987). Inoltre, *L. plantarum* può tollerare livelli di pH inferiori a 3.5 (Edwards *et al.*, 1993).

Fermentazioni alcoliche interrotte

Un serio problema che si presenta sporadicamente è rappresentato dalle fermentazioni lente o interrotte. Si verifica un prematuro arresto della crescita dei lieviti e della fermentazione alcolica, che da

luogo a vini con zuccheri non fermentati e con concentrazioni di etanolo inferiori a quelle desiderate (Fleet e Heard, 1993). Da un punto di vista commerciale, questi vini sono un problema, non solo per il loro gusto dolce e per la loro scarsa qualità organolettica, ma anche perché sono molto delicati da un punto di vista microbiologico. Molti sono i fattori che entrano in gioco nel determinare l'arresto di una fermentazione, ma talvolta le cause esatte non possono essere identificate. Tradizionalmente, tali fattori sono carenze nutritive, la presenza di sostanze inibenti e alcune pratiche tecnologiche.

Più recentemente, alcuni enologi hanno notato che la rapida alterazione del vino da parte dei microrganismi doppiava i "feroci" lattobacilli (Boulton *et al.*, 1996). Boulton *et al.* (1996) hanno caratterizzato questa alterazione nell'essere molto veloce con una crescita batterica abbondante nelle prime fasi della vinificazione e un arresto prematuro della fermentazione alcolica. Sebbene le interazioni tra i lieviti e i batteri lattici nei vini siano state a lungo studiate (Beelman *et al.*, 1982; King and Beelman, 1986; Lemaresquier, 1987; Edwards *et al*, 1990; Cannon and Pilone, 1993), la prima affermazione che *Lactobacillus* possa effettivamente inibire i lieviti è stata quella di Huang *et al.* (1996). Nel loro studio, l'inoculazione precoce dei ceppi YH-15, YH-24 e YH-37 determinava un rallentamento delle fermentazioni di Chardonnay fatte su scala di laboratorio ad opera di *Saccharomyces cerevisiae* Epernay 2. L'inoculo con YH-15 rallentava anche le fermentazioni da parte di *S. cerevisiae* EC1118. La rapida crescita di YH-15 nel succo d'uva non solfitato osservata da Huang *et al.* (1996) concordava con la descrizione di "feroci" lattobacilli data da Boulton *et al.* (1996), raggiungendo un picco di popolazione $>10^9$ CFU/mL due giorni dopo l'inoculo. L'inibizione del lievito ad opera dei lattobacilli era già stata osservata in altri cibi (Nakamura and Hartman, 1961; Noda *et al.*, 1980; Barbour and Priest, 1988; Essia Ngang *et al.*, 1990; Leroi and Pidoux, 1993).

Per mezzo delle tecniche del 16S rRNA sequencing, Edwards *et al.* (1998a) identificarono il ceppo YH-15 come una nuova specie di *Lactobacillus* e denominarono il ceppo *Lb. kunkeei*. E' interessante notare che i ceppi YH-24 e YH-37 anch'essi isolati da Huang *et al.* (1996) vennero poi identificati come appartenenti a *O. oeni* (Edwards *et al.*, 1998b). Più recentemente, è stato trovato un altro ceppo di *Lactobacillus* che inibiva i lieviti in una prova fatta su agar. Tale ceppo, LuE_{10}, è stato poi identificato come una nuova specie e denominato *Lb. nagelii* (Edwards *et al.*, 2000).

I meccanismi dell'inibizione dei lieviti

Boulton *et al.* (1996) indicarono che i "feroci" lattobacilli potevano in due o tre giorni produrre acido acetico a sufficienza per inibire il metabolismo dei lieviti. È risaputo che l'acido acetico inibisce i lieviti (Doores, 1993), influenzandone sia la crescita che la capacità fermentativa (Pampulha e Loureiro, 1989; Ramos e Madeira-Lopes, 1990; Kalathenos *et al.*, 1995). In accordo con ciò, Rasmussen *et al.* (1995) riferirono che l'aggiunta di 4 g/L di acido acetico a metà fermentazione rallentava la fermentazione stessa.

Huang *et al.* (1996) notarono che le fermentazioni rallentate o ferme inoculate con *L. kunkeei* contenevano elevate quantità di acidità volatile, circa 3 g/L. Anche Edwards *et al.* (1999b) notarono che la concentrazione di acido acetico nei mosti inoculati con *L. kunkeei* o con entrambi *S. cerevisiae* e *L. kunkeei* raggiungeva i 5 g/L. Quindi, queste acidità volatili così elevate notate da Huang *et al.* (1996) nei vini inoculati con *L. kunkeei* erano probabilmente il risultato della produzione di acido acetico da parte dei batteri piuttosto che da parte dei lieviti. Comunque, non si capì se questa quantità di acido acetico inibisse la crescita dei lieviti o inducesse il rallentamento o l'arresto delle fermentazioni. Un lavoro successivo rivelò che l'aggiunta sequenziale della stessa concentrazione di acido acetico prodotto da *L. kunkeei* comportava il rallentamento delle fermentazioni (Edwards *et al.*, 1999b). Questa scoperta sosteneva il concetto che la produzione batterica di acido acetico può rallentare la fermentazione alcolica, ma anche altri meccanismi sono possibili.

Da un punto di vista della vinificazione, occorre notare che l'uso della SO_2 rimane il metodo migliore per controllare le contaminazioni da *Lactobacillus* (Hood, 1983; Liu and Gallander, 1983; Wibowo *et al.*, 1985; Edwards *et al.*, 1999a). Come altri microrganismi del vino, i batteri lattici presentano diversi gradi di tolleranza a questo additivo (Beelman *et al.*, 1977; Wibowo *et al.*, 1985; Davis *et al.* 1986a; 1986b; 1988; Britz and Tracey, 1990; Edwards *et al.*, 1991; 1993). La SO_2 legata o libera non ha un'attività molto inibente sui microrganismi del vino; è la forma molecolare che è antimicrobica. La quantità di SO_2 molecolare presente in un vino dipende dalla concentrazione di SO_2 libera e dal pH del mosto/vino (Zoecklein *et al.*, 1995). In generale, 0.8 mg/L di SO_2 molecolare sono sufficienti per inibire completamente i batteri lattici (Zoecklein *et al.*, 1995). Sebbene i lattobacilli e i pediococchi siano più sensibili alla SO_2 di *O. oeni*, alcuni studi (Costello *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1986a; 1988; Edwards *et al.*, 1993) hanno osservato la crescita di specie di questi microrganismi in vini che contenevano più di 30 mg/L di SO_2 totale. Fortunatamente, sembra che alcuni lattobacilli implicati nelle fermentazioni lente siano sensibili alla SO_2 (Edwards *et al.*, 1999a).

Metodi di rilevamento

I metodi per il controllo delle alterazioni da parte dei microrganismi sono sia di tipo chimico (per esempio l'acidità volatile, il 4-etil fenolo, amine biogene, ecc.) che di tipo microbiologico (per esempio, crescita su terreni specifici, metodi biochimici, ecc.). Forse il metodo più importante utilizzato nelle cantine è l'utilizzo di un microscopio a contrasto di fase. La comparsa al microscopio di cellule singole viene usato per l'identificazione iniziale usando guide stabilite (Edwards, 2005). Sebbene questo metodo possa essere invalidato dall'errore umano nel riconoscimento della morfologia delle cellule, esso è rapido e relativamente economico.

Attualmente, per ottenere una maggiore precisione vengono utilizzate tecniche per l'analisi qualitativa e quantitativa del DNA (Fugelsang and Edwards, 2007). In generale, questi metodi si basano su primer che reagiscono con determinate porzioni di DNA di microrganismi; una di queste è la tecnica Scorpions™ (Arvik, 2006). Oltre al rilevamento di specifici microrganismi, questi metodi sono stati usati per quantificare il numero di microrganismi presenti (maggiore quantità di DNA nel vini = popolazione più numerosa di microrganismi). Comunque, sia il rilevamento che la quantificazione si basano sulla supposizione che il DNA dei microrganismi rimanga rilevabile nel vino per un breve periodo di tempo, ma questa supposizione è stata messa in dubbio (Mills, 2006). Inoltre, è importante che questi metodi siano in grado di rilevare tutte le specie microbiche che si ritiene siano presenti nei vini (non tutti i metodi hanno i primer necessari).

Ringraziamenti

L'autore ringrazia Lallemand (Montréal, Quebec), il Washington Wine Advisory Committee e il Northwest Center for Small Fruits Research per l'assistenza finanziaria e i ceppi di lieviti/batteri avuti a supporto di tale ricerca. In fine, rivolgo sincera gratitudine a Gianni Trioli e Vinidea per l'invito ad intervenire a Enoforum 2007.

Bibliografia

Amerine, M.A., and R.E. Kunkee. Microbiology of wine-making. Ann. Rev. Microbiol. 22: 323-358 (1968).

Arvik, T. Rapid detection of wine spoilage microorganisms using Scorpions™ technology. *In:* Proceedings of the International Wine Microbiology Symposium. CATI publication #060702. Tenaya Lodge, Yosemite, CA, April 4-5 (2006).

Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. S. Salminen and A. von Wright (Eds.), pp. 1-72. Marcel Dekker Inc., New York, NY (1998).

Barbour, E.A. and F.G. Priest. Some effects of *Lactobacillus* contamination in Scotch whisky fermentations. J. Inst. Brew. 94: 89-92 (1988).

Beelman, R.B., R.M. Keen, M.J. Banner, and S.W. King. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. Dev. Ind. Microbiol. 23: 107-121 (1982).
Benito de Cárdenas, I.L., O.V. Ledesma, A.A. Pesce de Ruiz Holgado, and G. Oliver. Effect of lactate on the growth and production of diacetyl and acetoin by lactobacilli. J. Dairy Sci. 68: 1897-1901 (1985).
Boulton, R.B., V.L. Singleton, L.F. Bisson, and R.E. Kunkee. *Principles and Practices of Winemaking*. 604 pp. Chapman and Hall, New York (1996).
Britz, T.J. and R.P. Tracey. The combination effect of pH, SO_2, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bact. 68: 23-31 (1990).
Cannon, M.C., and G.J. Pilone. Interactions between commercial wine yeast and malolactic bacteria. In: *The New Zealand Grape and Wine Symposium*. Vol. 8. D.T. Jordon (Ed.). pp 85-95. The New Zealand Society for Viticulture and Oenology, Auckland, New Zealand (1993).
Carr, F.J., D. Chill, and N. Maida. The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. Rev. Microbiol. 28: 281-370 (2002).
Cavin, J.F., V. Andioc, P.X. Etievant, and C. Divies. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. Am. J. Enol. Vitic. 44: 76-80 (1993).
Chalfan, Y., I. Goldberg, and R.I. Mateles. Isolation and characterization of malolactic bacteria from Israeli red wines. J. Food Sci. 41: 939-943, 968 (1977).
Chatonnet, P., D. Dubourdieu, J.-N. Boidron, and M. Pons. The origin of ethylphenols in wines. J. Sci. Food Agric. 60: 165-178 (1992).
Chatonnet, P., D. Dubourdieu, and J.N. Boidron. The influence of *Brettanomyces*/*Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. Am. J. Enol. Vitic. 46: 463-468 (1995).
Costello, P.J., G.J. Morrison, T.H. Lee, and G.H. Fleet. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. Food Technol. Aust. 35: 14-18 (1983).
Davis, C.R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee, and G.H. Fleet. Practical implications of malolactic fermentation: a review. Am. J. Enol. Vitic. 36: 290-301 (1985).
Davis, C.R., D.J. Wibowo, T.H. Lee, and G.H. Fleet. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentations of wines at different pH. Appl. Environ. Microbiol. 51: 539-545 (1986a).
Davis, C.R., D.J. Wibowo, T.H. Lee, and G.H. Fleet. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. Food Technol. Aust. 38: 35-40 (1986b).
Davis, C.R., D. Wibowo, T.H. Lee, and G.H. Fleet. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. Am. J. Enol. Vitic. 39: 137-142 (1988).
Delfini, C. M. Cersosima, V. Del Prete, M. Strano, G. Gaetano, A. Pagliara, and S. Ambrò. Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. J. Agric. Food Chem. 52: 1861-1866 (2004).
Dias, L., S. Dias, T. Sancho, H. Stender, A. Querol, M. Malfeito-Ferreira, and V. Loureiro. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiol. 20: 567-574 (2003).
Dicks, L.M.T., and H.J.J. van Vuuren. Identification and physiological characteristic of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wine. J. Appl. Bacteriol. 64: 505-513 (1988).
Doores, S. Organic acids. In: *Antimicrobials in Foods*. pp. 95-136. Marcel Dekker, Inc., New York (1993).
Douglas, H.C. and W.V. Cruess. A *Lactobacillus* from California wine: *Lactobacillus hilgardii*. Food Res. 1: 113-119 (1936).
Du Plessis, L.D.W. and J.A. van Zyl. The microbiology of South African winemaking. Part IV. The taxonomy and incidence of lactic acid bacteria from dry wines. S. Afr. J. Agric. Sci. 6: 261-273 (1963).
Du Toit, M. and I.S. Pretorius. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. S. Afr. J. Enol. Vitic. 21: 74-96 (2000).
Edwards, C.G. *Illustrated Guide to Microbes and Sediments in Wine, Beer, and Juice*. WineBugs LLC, Pullman, WA (2005).
Edwards, C.G. and K.A. Jensen. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington state wines: *Pediococcus* spp. Am. J. Enol. Vitic. 43: 233-238 (1992).
Edwards, C.G., R.B. Beelman, C.E. Bartley, and A.L. McConnell. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. Am. J. Enol. Vitic. 41: 48-56 (1990).
Edwards, C.G., K.A. Jensen, S.E. Spayd, and B.J. Seymour. Isolation and characterization of native strains of *Leuconostoc oenos* from Washington State wines. Am. J. Enol. Vitic. 42: 219-226 (1991).

Edwards, C.G., J.R. Powers, K.A. Jensen, K.M. Weller, and J.C. Peterson. *Lactobacillus* spp. from Washington State wines: isolation and characterization. J. Food Sci. 58: 453-458 (1993).

Edwards, C.G., J.C. Peterson, T.D. Boylston, and T.D. Vasile. Interactions between *Leuconostoc oenos* and *Pediococcus* spp. during vinification of red wines. Am. J. Enol. Vitic. 45: 49-55 (1994).

Edwards, C.G., K.M. Haag, M.D. Collins, R.A. Hutson, and Y.C. Huang. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov., a spoilage organism associated with grape juice fermentations. J. Appl. Microbiol. 84: 698-702 (1998a).

Edwards, C.G., K.M. Haag, and M.D. Collins. Identification and characterization of two lactic acid bacteria associated with sluggish/stuck fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 49: 445-448 (1998b).

Edwards, C.G., K.M. Haag, M.J. Semon, A.V. Rodriguez, and J.M. Mills. Evaluation of processing methods to control the growth of *Lactobacillus kunkeei*, a micro-organism implicated in sluggish alcoholic fermentation of grape musts. S. Afr. J. Enol. Vitic. 20: 11-19 (1999a).

Edwards, C.G., A.G. Reynolds, A.V. Rodriguez, M. Semon, and J. Mills. Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentation and inhibition of yeast by *Lactobacillus* sp. Am. J. Enol. Vitic. 50: 204-210 (1999b).

Edwards, C.G., M.D. Collins, and A.V. Rodriguez. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially-fermented wine. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 50: 699-702 (2000).

El-Gendy, S.M., H. Abdel-Galil, Y. Shahin, and F.Z. Hegazi. Acetoin and diacetyl production by homo- and heterfermentative lactic acid bacteria. J. Food Prot. 46: 420-425 (1983).

Essia Ngang, J.J., F. Letourneau, E. Wolniewicz, and P. Villa. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 490-493 (1990).

Fleet, G.H., S. Lafon-Lafourcade, and P. Ribéreau-Gayon. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1034-1038 (1984).

Fleet, G.H., and G.M. Heard. Yeast: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.). pp 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland (1993).

Fornachon, J.C.M. The occurrence of malo-lactic fermentation in Australian wines. Aust. J. Appl. Sci. 8: 120-129 (1957).

Fugelsang, K.C. and C.G. Edwards. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Second edition. Springer Science and Business Media, NY (2007).

Fugelsang, K.C., M.M. Osborn, and C.J. Muller. *Brettanomyces* and *Dekkera*: Implications in wine making. American Chemical Society Symposium Series. 536: 110-129 (1993).

Garvie, E.I. Genus *Pediococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Eds.), pp. 1075-1079. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD (1986).

Garvie, E.I. Nomenclatural problems of the pediococci. Request for an opinion. Int. J. Sys. Bacteriol. 24: 301-306 (1974).

Gilliland, R.B. *Brettanomyces*. I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavour. J. Inst. Brew. 67: 257-261 (1961).

Gindreau, E., E. Walling, and A. Lonvaud-Funel. Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. J. Appl. Microbiol. 90: 535-542 (2001).

Gini, B. and R.H. Vaughn. Characteristics of some bacteria associated with the spoilage of California dessert wines. Am. J. Enol. Vitic. 13: 20-31 (1962).

Grbin, P.R. and P.A. Henschke. Mousy off-flavor production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. Aust. J. Grape Wine Res. 6: 255-262 (2000).

Heresztyn, T. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. Am. J. Enol. Vitic. 37: 127-132 (1986).

Hood, A. Inhibition of growth of wine lactic-acid bacteria by acetaldehyde-bound sulphur dioxide. Aust. Grape. Wine. 232: 34-43 (1983).

Huang, Y.-C., C.G. Edwards, J.C. Peterson, and K.M. Haag. Relationship between sluggish fermentations of grape juice and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. Am. J. Enol. Vitic. 47: 1-10 (1996).

Kalathenos, P., J.P. Sutherland, and T.A. Roberts. Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. J. Appl. Bacteriol. 78: 245-250 (1995).

Kandler, O. and N. Weiss. Genus *Lactobacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Ed.), p. 1209. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1986).

Kelly, W.J., R.V. Asmundson, and D.H. Hopcroft. Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. Am. J. Enol. Vitic. 40: 277-282 (1989).

Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, A. Lonvaud-Funel, and P. Ribéreau-Gayon. Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *L. oenos* après réactivation. Connaiss. Vigne Vin. 17: 55-71 (1983a).

Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribéreau-Gayon. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. Appl. Environ. Microbiol. 46: 874-880 (1983b).

Lemaresquier, H. Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 4: 91-94 (1987).

Leroi, F. and M. Pidoux. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. J. Appl. Bacteriol. 74: 54-60 (1993).

Liu, J.R., and J.F. Gallander. Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. Am. J. Enol. Vitic. 34: 44-46 (1983).

Llaubéres, R.M., B. Richard, A. Lonvaud, D. Dubourdieu, and B. Fournet. Structure of an exocellular β-D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. Carb. Res. 203: 103-107 (1990).

Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhoek 76: 317-331 (1999).

Lonvaud-Funel, A. and A. Joyeux. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. Food Microbiol. 10: 411-419 (1993).

Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux, and O. Ledoux. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. J. Appl. Bacteriol. 71: 501-508 (1991).

Lonvaud-Funel, A., O. Guilloux, and A. Joyeaux. Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. J. Appl. Bacteriol. 74: 41-47 (1993).

Manca de Nadra, M.C., and A.M. Strasser de Saad. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. Int. J. Food Microbiol. 27: 101-106 (1995).

Maret, R. and T. Sozzi. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). I. Lactobacilles et pédiocoques. Ann. Technol. Agric. 27: 255-273 (1977).

Maret, R. and T. Sozzi. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). II. Evolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dole). Ann. Technol. Agric. 28: 31-40 (1979).

Mills, D.A. Molecular methods to characterize wine microorganisms. *In:* Proceedings of the International Wine Microbiology Symposium. CATI publication #060702. Tenaya Lodge, Yosemite, CA, April 4-5 (2006).

Montville, T.J., M.E. Meyer, and A.H.M. Hsu. Influence of carbon substrates on lactic acid, cell mass, and diacetyl-acetoin production in *Lactobacillus plantarum*. J. Food Prot. 50: 42-46 (1987).

Nakamura, L.K. and P.A. Hartman. *Lactobacillus*:yeast interrelationships. J. Bacteriol. 81: 519-523 (1961).

Noda, F., K. Hayashi, and T. Mizunuma. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soy sauce. Appl. Environ. Microbiol. 40: 452-457 (1980).

Pampulha, M.E. and V. Loureiro. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotech. Lett. 11: 269-274 (1989).

Pilone, G.J., R.E. Kunkee, and A.D. Webb. Chemical characterization of wines fermented with various malolactic bacteria. Appl. Microbiol. 14: 608-615 (1966).

Raccach, M. Pediococci and biotechnology. CRC Crit. Rev. Microbiol. 14: 291-309 (1987).

Ramos, M.T. and A. Madeira-Lopes. Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotech. Lett. 12: 229-234 (1990).

Rankine, B.C. and D.A. Bridson. Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malo-lactic fermentation. Aust. Wine, Brew. Spirit Rev. 90: 44, 46, 48, 50 (1971).

Rasmussen, J.E., E. Schultz, R.E. Snyder, R.S. Jones, and C.R. Smith. Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 46: 278-280 (1995).

Shinohara, T., S. Kubodera, and F. Yanagida. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. J. Biosci. Bioeng. 90: 90-97 (2000).

Sieiro, C., J. Cansado, D. Agrelo, J.B. Velázquez, and T.G. Villa. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2936-2938 (1990).

Silver, J. and T. Leighton. Control of malolactic fermentation in wine. 2. Isolation and characterization of a new malolactic organism. Am. J. Enol. Vitic. 32: 64-72 (1981).

Splittstoesser, D.F. and B.O. Stoyla. Lactic acid spoilage in wine. Wines Vines 68: 65-66 (1987).

Sponholz, W.R. Wine spoilage by microorganisms. *In:* Wine Microbiology and Biotechnology. G.H. Fleet (Eds.). pp 395-420. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland (1993).

Vaughn, R.H. Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. Adv. Food. Res. 6: 67-108 (1955).

Walling, E., M. Dols-Lafargue, and A. Lonvaud-Funel. Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by ropy *Pediococcus damnosus* IOEB8801. Food Microbiol. 22: 71-78 (2005).

Weiss, N., U. Schillinger, and O. Kandler. *Lactobacillus trichodes* and *Lactobacillus heterohiochii*, subjective synonyms of *Lactobacillus fructivorans*. System. Appl. Microbiol. 4: 507-511 (1983).

Wibowo, D., R. Eschenbruch, C.R. Davis, G.H. Fleet, and T.H. Lee. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. Am. J. Enol. Vitic. 36: 302-313 (1985).

Zoecklein, B.W., K.C. Fugelsang, B.H. Gump, and F.S. Nury. *Wine Analysis and Production*. 621 pp. Chapman and Hall Publishers, New York (1995).